

Roles of bovine leukemia virus tax protein on viral propagation and apoptotic process

| | |
|------|--|
| 著者 | Takahashi Masahiko |
| 内容記述 | Thesis (Ph. D. in Science)--University of Tsukuba, (A), no. 3526, 2004.3.25 Includes bibliographical references |
| 発行年 | 2004 |
| URL | http://hdl.handle.net/2241/5687 |

| | | | |
|---------|--|-------|---------|
| 氏 名（本籍） | 高橋 雅彦（栃木県） <small>たか はし まさ ひこ</small> | | |
| 学位の種類 | 博士（理学） | | |
| 学位記番号 | 博 甲 第 3526 号 | | |
| 学位授与年月日 | 平成 16 年 3 月 25 日 | | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 | | |
| 審査研究科 | 生物科学研究科 | | |
| 学位論文題目 | Roles of Bovine Leukemia Virus Tax Protein on Viral Propagation and Apoptotic Process (牛白血病ウイルスの発現とアポトーシス誘導能における Tax タンパク質の役割) | | |
| 主 査 | 筑波大学教授 | 農学博士 | 田 仲 可 昌 |
| 副 査 | 筑波大学教授 | 理学博士 | 鎌 田 博 |
| 副 査 | 筑波大学助教授 | 理学博士 | 漆 原 秀 子 |
| 副 査 | 筑波大学客員教授 | 獣医学博士 | 間 陽 子 |

論文の内容の要旨

牛白血病ウイルス（bovine leukemia virus ; BLV）はウシに地方病性牛白血病を誘発する。BLV は典型的な癌遺伝子を持たないが、その 3' 端に存在する *pX* 領域ウイルス遺伝子の発現を制御するのみならず、白血病誘導の主要因とも考えられている、Tax タンパク質を発現する。そこで本研究では、変異型 Tax を用いて、BLV の発現とアポトーシス活性における Tax タンパク質の役割を解析した。

最初に、変異型 Tax をコードする BLV 感染性プラスミドを構築して、*in vitro* の系でそのウイルス増殖能を解析した。その結果、変異型 BLV は 1) ウイルス抗原の発現とウイルス粒子の放出を増加させ、2) 多核巨細胞形成能を増強し、さらに、3) ウイルスの伝搬力を上昇させることが明らかとなった。一方、BLV の感染機構を研究するための有用な実験動物であるヒツジにプラスミドを接種した場合には、変異型 *tax* を有する BLV 感染細胞の割合およびウイルス mRNA の発現動態は野生型のそれと比較して差異が認められなかった。以上の結果から、生体内ではウイルス発現に対して抑制的に作用する機構が存在する可能性が示唆された。

次に、変異型 *tax* を有する BLV が *ex vivo* および *in vitro* において、アポトーシス制御に与える影響を解析した。まず、上述の野生型および変異型 BLV 感染羊から分離した末梢血単核球 (PBMC) を *ex vivo* 培養し、アポトーシス活性を測定した。BLV 感染細胞では BLV 抗原の発現量に比例して、アポトーシスの抑制が観察されたが、その程度は、野生型 BLV 発現細胞より変異型でより強かった。即ち、本来非感染個体から分離された PBMC を *ex vivo* で培養する際に観察されるアポトーシスを変異型 BLV がより強く抑制することが示された。さらに、野生型および変異型 BLV クローンを 293T 細胞に導入して、アポトーシス活性を測定した。すると、共に BLV 発現細胞に特異的にアポトーシスが誘導されたが、その程度は変異型で特に顕著であった。この現象が Tax により誘導されるかどうかを調べるために、野生型および変異型 Tax 発現ベクターを導入すると、野生型に比較して、変異型 Tax による顕著なアポトーシス活性の上昇が観察された。

次に、*ex vivo* 培養において観察された、BLV による抗アポトーシス効果の標的となるリンパ球サブセットの同定を試みた。興味深いことに、二つの B 細胞サブセットの内、ヒツジにおける腫瘍化の標的である

BLV 発現 CD5 陰性 B 細胞に強いアポトーシスの抑制が認められた。一方、BLV 発現 CD5 陽性 B 細胞には僅かなアポトーシスの抑制が認められたに過ぎなかった。さらに、非感染羊由来 PBMC の培養系に BLV 感染羊由来の PBMC の培養上清を添加すると、CD5 陽性 B 細胞に比較して、CD5 陰性 B 細胞において強い抗アポトーシス効果が観察された。これらの結果は、二つのサブセット間にはアポトーシスに対する感受性の差異が存在すること、腫瘍化の標的である CD5 陰性 B 細胞に強い抗アポトーシス効果があることが明らかとなった。

以上のような観察結果から以下のことが示唆された。

- 1) *in vitro* で認められた Tax 変異体の転写活性化の増強活性が *in vivo* では消失したことから、Tax にうち勝ってウイルス発現を負に制御する機構が感染個体に存在する可能性が初めて示された。
- 2) BLV は *in vitro* において Tax を介してアポトーシスを誘導するが、一方、末梢血リンパ球を *ex vivo* 培養すると、速やかにウイルス抗原が発現し、それに伴ってアポトーシスを抑制することが明らかにされた。
- 3) アポトーシスの抑制効果が癌化の標的細胞に惹起されたことから、抗アポトーシス活性の結果として腫瘍化が誘導される可能性が示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、野生型より強力に転写活性化し、ウイルス複製を著しく上昇させる変異型 Tax 用いて、BLV の発現とアポトーシス活性における Tax タンパク質の役割を明らかにしたものである。特に、*in vitro*、*ex vivo* および羊を用いた *in vivo* の系を使い分けた実験により、Tax タンパク質は BLV の発現およびアポトーシス活性を *in vitro* では正に、*in vivo* (*ex vivo*) では負に制御することを証明し、生体内には Tax によるウイルス発現とアポトーシス誘導活性に対して抑制的に作用する因子が存在する可能性を明らかにした功績は極めて多きい。また、癌化の標的である CD5 陰性 B 細胞が *ex vivo* における抗アポトーシス活性の標的であることを立証し、抗アポトーシス活性と腫瘍化の関連性を示した点が高く評価できる。これら結果はウイルス性発癌の研究分野に今後大きな貢献をするものと期待される。また、これまで困難とされてきた BLV の感染性プラスミドを用いたウイルス実験の *in vitro* および *in vivo* の系を確立した功績は大きく、得られた成果は BLV に最も近縁である成人 T 細胞白血病ウイルスの研究に大きく貢献すると思われる。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。